

MOLEKULÁRIS NYÁRFANEMESÍTÉS (*POPULUS X CANESCENS*) ÖKOREMEDIÁCIÓS ALKALMAZÁSRA

BITTSÁNSZKY A^{1,2}, GYULAI G^{1*}, TÓTH Z¹, HORVÁTH M³, FEKETE I³, SZABÓ Z^{1,4}, HELTAI
GY³, GULLNER G², KŐMÍVES T², HESZKY L¹

^{1,3,4}Szent István Egyetem,
¹Genetika és Biotechnológiai Intézet,
³Környezettudományi Intézet,
⁴Növénytani Intézet,
2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

²MTA Növényvédelmi Kutató Intézete,
1022 Budapest, Herman Ottó u. 15.

*e-mail: gyulai.gabor@mkk.szie.hu

ABSTRACT – Molecular breeding of poplar (*Populus x canescens*) for ecoremediation purposes

Three new types of poplar clones (*Populus* ssp) were developed *in vitro* with increased level of phytoremediation capacity. First, a paraquat (4×10^{-7} M) tolerant aspen (*Populus canescens*) clones were selected *in vitro*, which showed a 22-fold increment in *gst* (glutathione-S-transferase) gene activity coupled with 1.3-fold GST (glutathione-S-transferase) enzyme activity at sublethal paraquat concentration (4×10^{-7} M). Second, a DHAC (5,6-dihydro-5'-azacytidine hydrochloride) induced (10^{-4} M for 7 days) epigenetic clones were developed after DNA-demethylation in aspen (*Populus canescens*), which showed increased level of *gst* and *gsh* gene activity in RT-qPCR analysis. Third, *gsh1* transgene was reactivated in two stable transgenic poplar (*Populus canescens*) clones (6lgl, 11ggs). After *in vitro* micropropagation and rooting, clones were transplanted in glass houses, followed by field performance analyses for phytoremediation capacity (environmental clean up using plants) in heavily contaminated area at Balatonfüzfő, Hungary.

Kulcsszavak: nyárfa, molekuláris nemesítés, *in vitro* nemesítés

Keywords: poplar, molecular breeding, *in vitro* breeding

BEVEZETÉS

A fito/öko remediáció a szennyezett talajok gyors méregtelenítésére alkalmazott környezetbarát technológia. Ennek során olyan növényfajokat telepítünk a területre, amelyek természetes nehézfémfelvételi és méregtelenítő kapacitással rendelkeznek (*hiperakkumulátor* növények). A tarsóka fajok közül a halacsi tarsóka (*Thlaspi goesingense*) és a havasi tarsóka (*Thlaspi caerulescens*); a repce fajok közül a szareptai mustár (*Brassica juncea*), míg a füvek közül a pelyhes selyemperje (*Holcus lanatus*) és a cérnatippán (*Agrostis tenuis*, syn.: *A. castellana*) a jelentős (CHANEY *et al.*, 2007). Ezek a növények, azonban kevés fitomasszát termelő apró fajok, ezért méregtelenítő képességük csak az elméleti kutatásokra alkalmazható. Megoldást a gyors növekedésű, hosszú életidejű fafajok (fűz és nyár) jelentik (PEUKE & RENNENBERG, 2005).

A biológiai szervezetekkel történő remediációnak számos előnye van. Összehasonlítva a létező fizikai és kémiai remediációs módszerekkel, a növények használata nagyságrendekkel olcsóbb, nem vagy alig káros a környezetre és társadalmilag széles körben elfogadott. A módszer hátrányai, hogy lassú, csak a gyökérzónában lévő szennyeződéseknél alkalmazható, illetve a szennyező anyagok koncentrációja a toxicitási küszöb alatt kell legyen amit a növények még el tudnak viselni. Hagyományos és modern növénynemesítési módszerekkel

ezek a hátrányok csökkenthetőek esetleg meg is szüntethetőek. Munkánkban célul tűztük ki, hogy nyárfá stressztűrő-képességét valamint méregtelenítő kapacitását megnöveljük. Három technológia áll rendelkezésre: (1) nehézfém vagy toxikus anyagokkal szemben ellenálló klónok sejtvonala szelekciója, izolálása és felszaporítása, (2) a detoxifikációban szerepet játszó saját növényi gének (pl. *gsh*: γ -glutamil-cisztein szintáz és *gst*: glutation S-transzferáz) DNS demetilációval serkentett génaktivációja, és (3) ugyanezen gének prokariotikusan aktívabb paralógjainak a nyárfába történő beültetésével. Munkánk során mindhárom technológiával állítottunk elő új szürkenyár fajtaikat és alkalmaztuk *in situ* szennyezett területen (Balatonfüzfő).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényanyag: A vizsgálatokhoz a szürkenyár-hibrid (*Populus tremula* \times *Populus alba* = *Populus* \times *canescens*) klónjait alkalmaztuk (INRA No.717-1-B4). A klónokat mikroszaporítással tartottuk fenn (KISS, 1999; GYULAI *et al.*, 2008a). A géntechnológiával módosított növényeket az *Escherichia coli* baktériumból származó γ -glutamil-cisztein szintáz (γ -ECS) enzimet kódoló génnel (*gsh1*) transzformálták. Az enzim a glutation tripeptid bioszintézisének első lépését katalizálja. A transzformáció hatására a növények endogén glutationtartalma megemelkedett (ARISI *et al.*, 1997; NOCTOR *et al.*, 1998).

In vitro táptalajok: A nyárnövények *in vitro* fenntartásához, mikroszaporításához, valamint a stresszkísérletekhez WPM (Woody Plant Media) táptalajt (LLOYD & MCCOWN, 1980) használtunk. Hajtásregeneráláshoz valamint a levélkorong-tesztekhez a táptalajt a következő hormonokkal egészítettük ki: 1 mg/l benziladenin, 0,2 mg/l naftilecetsav (GYULAI *et al.*, 2005; BITTSÁNSZKY *et al.*, 2008).

DHAC és paraquat kezelés levélkorong tesztben: A levélkorong tenyészetet GYULAI *et al.*, (1995, 2005) módszere szerint végeztük 2 % szacharózzal kiegészített WPM táptalon. A paraquat kezelést 4×10^{-7} M koncentrációban, a DHAC (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) kezelést 10^{-4} M-ban alkalmaztuk (BITTSÁNSZKY *et al.*, 2003a, 2003b, 2004, 2005a, 2006). A tenyészeteket $22 \pm 2^\circ\text{C}$ -on, 16 h fény ($40 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$) / 8 h sötét fotoperiódus mellett, 8 napon keresztül inkubáltuk (BITTSÁNSZKY *et al.*, 2007a, 2007b; GYULAI *et al.*, 2008b).

Paraquat stressz in vitro: Hormonokkal kiegészített (1 mg/l BA; 0,2 mg/l NAA) WPM táptalajhoz eltérő mennyiségű paraquatot (metil-viologén, Sigma) adagoltunk. A paraquat végkoncentrációit a táptalajokban a következő értékekre állítottuk be: 4×10^{-3} M; 4×10^{-4} M; 4×10^{-5} M; 4×10^{-6} M; 4×10^{-7} M; 4×10^{-8} M; 4×10^{-9} M; 4×10^{-10} M, valamint paraquat nélküli kontroll. A sterilre szűrt paraquat oldatot az autoklávozott táptalajhoz szilárdulás előtt adagoltuk. Az elkészített, agarral szilárdított táptalajokat petricsészékbe öntöttük. Steril, két hónapos nyárfá hajtások fiatal leveleiből vágott levélkorongokat helyeztünk a tesztelő táptalajokra, színükkel felfelé, kezelésenként 15-öt (BITTSÁNSZKY *et al.*, 2006; GYULAI, 2007). A tenyészeteket $22 \pm 2^\circ\text{C}$ -on 16 h fény ($40 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$) / 8 h sötét fotoperiódusú fényszobában 8 napon keresztül inkubáltuk (BITTSÁNSZKY *et al.*, 2005a, 2005b; GULLNER *et al.*, 2005).

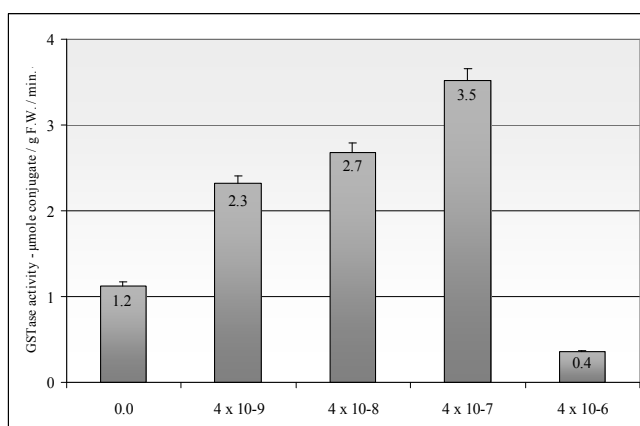
Molekuláris módszerek. DNS-izolálás: Genomikus DNS izolálást 0,1 g friss levélszövetből végeztük CTAB (cetiltrimetilammónium bromid) extrakciós pufferrel. **RNS izolálás, cDNS szintézis:** Az RNS izolálást Absolutely RNA Miniprep Kit-tel (# 400800, Stratagene, USA – Biomedica, Hungary) végeztük. A kivont RNS minták minőségét és mennyiségét (2 μl RNS) NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA – BioScience, Budapest, Hungary) határoztuk meg. **cDNS szintézis.** Az egyszálú cDNS-t az mRNS templáton reverz transzkripcióban oligo(dT)₁₈ primer alkalmazásával szintetizáltuk (Fermentas – Biocenter (Szeged, Hungary; # K1622).

Primerek: A cDNS (2,5 µl) minták génexpressziós analíziséhez gén-specifikus primereket terveztünk a „Primer3” program segítségével. A *gst* génszakaszra (232 nt): az 5'-aca aga aag agc c(a/g) ttc c -3' / 5'-agc tcc cag ttc agc ttt ga-3' primerpárt alkalmaztuk. Belső kontrollnak a konstitutívan expresszáldó *α-tubulin* gén expresszióját mértük az 5'-taa ccg cct tgt ttc tca gg-3' / 5'-cct ggg gta tgg aac caa gt-3' primer-pár alkalmazásával. **Kiértékelés:** A vizsgált gének expressziós szintjeit a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel határoztuk meg (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; BITTSÁNSZKY *et al.*, 2007b).

Biokémiai mérések: Az oxidatív stresszel szembeni védekezéshez kapcsolódó enzimek aktivitását spektrofotometriásan határoztuk meg (GULLNER *et al.*, 2005).

EREDMÉNYEK

Paraquat toleráns klónok szelekciója: Paraquat herbicidet különböző koncentrációkban a táptalajba adagoltuk *in vitro* és nodális szegmenteket tenyésztettünk rajtuk. A paraquat hatását vizuális megfigyeléssel illetve a glutation S-transzferáz (GST) enzim mérésével követtük nyomon. A szelektív koncentrációnak a szubletális 4×10^{-7} M paraquat koncentráció bizonyult. 10^{-6} M, paraquat koncentrációnál nodális szegmentek teljesen kifehéredtek és a GST enzim aktivitása lecsökkent (1. ábra). A szubletális koncentráción kifejlődött hajtásokat leválasztottuk és paraquatot tartalmazó (4×10^{-7} M) gyökereztető táptalajba helyeztük. Összesen 3 zöld hajtást gyűjtöttünk az 500 inkubált nodális szárszegmentről. Ezeken a hajtásokon nem tapasztaltunk károsodást, amelyek a kialakult paraquat toleranciát jelentik.



1. ábra Glutation S-transzferáz enzim aktivitása vad típusú szürkenyár (*P. x canescens*) klónokon négy paraquat koncentráció mellett.

Három antioxidáns enzim (aszcorbát-peroxidáz, glutation-reduktáz és glutation S-transzferáz) aktivitását vizsgáltuk a paraquat-toleráns és kontroll nyárfa levélszöveiben. Ezek az antioxidáns enzimek az oxidáló hatású hidrogén-peroxidot, valamint különböző szerves peroxidokat képesek lebontani a növényi sejtekben. A paraquat-toleráns és normál nyárfák kezeletlen leveleinek aszcorbát-peroxidáz, glutation-reduktáz és glutation S-transzferáz aktivitása között nem tapasztaltunk lényeges eltérést.

Ezt követően megmértük a paraquat-toleráns és normál nyárfalevelek cisztein és glutation (GSH) tartalmát HPLC módszerrel. A glutation tartalom lényegesen magasabb a paraquat toleráns vonal leveleiben, ami arra utal, hogy ennek a növénynek fokozottabb a toleranciája oxidációs stresszel és különböző GSH segítségével lebomló herbicidekkel szemben (acetoklór, metolaklór, atrazin, aciflorfen stb). A levelek cisztein tartalma nem tért el a szignifikáns módon a két biotípus levelei között.

Gsh1 transzgenikus nyárfák tesztelése: A megemelt glutationtartalmú nyárfákról már bebizonyosodott, hogy fitoremediációs képességük nagyobb, mint a vad típusúaké (BITTSÁNSZKY *et al.*, 2005b). Ezeket a transzgenikus fákat már több mint tíz éve állították elő és azóta mikroszporitással tartják fenn. Molekuláris vizsgálatok igazolják, hogy a transzgen azóta is stabilan jelen van a növényekben, nem történt szegregáció illetve elimináció (GYULAI *et al.*, 2005). Az esetlegesen metilációval történt transzgen-lecsendesítés visszafordítására végeztük el a demetilációs kísérleteket.

DHAC kezelés hatása: A *gsh1* transzgen expressziója a 6Lgl klónban 13,5-szer volt magasabb a 11ggs klónhoz képest és ez a különbség DHAC kezelés hatására megduplázódott (1. táblázat). A megfigyelt expressziós mintázat pont az ellenkezője a transzgen relatív kópiaszámának, ugyanis az kisebb a 6Lgl klónban.

A nyárfa endogén *gsh1* génje szignifikánsan magasabb válaszadó képességgel rendelkezett a demetilációra mint a transzgen *gsh1*. Különösen nagy volt az expresszió a vad típusú nyárfa klónban (19,7-szeres) a transzgenikus 6Lgl (8,7-szeres) és 11ggs (2,5-szörös) klónokhoz képest. Ez a különbség a transzgen és az endogén gén közötti különbséget jelentheti metilációs kapacitásban. (1. táblázat)

A nyárfa *gst* gén expressziós szintjét (*gst*-mRNA) közel ötszörösére növeltük a DHAC kezeléssel (2. táblázat), amely expressziós szint tovább nőtt a paraquat stressznek is kitett mintákban (11,2-szeres növekedés). Az eredmények igazolják, hogy a DHAC-indukált DNS-demetiláció igen hatékony módszere a gének aktivációjának, a génexpresszió növelésének (BITTSÁNSZKY *et al.*, 2007b; GYULAI *et al.*, 2008a). Egyben bizonyítják, hogy a *gst* gén promotere stressz induktív.

1. táblázat A 11ggs, 6Lgl és kontroll (WT) szürkenyár klónokból vágott kezeletlen és DHAC kezelt (10^{-4} M, 7 nap) levélkorongokban mért transzgen *gsh1* és a nyárfa endogén *gsh1* expressziója.

Nyárfa klónok	<i>gsh1</i> -transzgen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			<i>gsh1</i> -nyárfa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	kezeletlen	DHAC	növekedés	kezeletlen	DHAC	növekedés
11ggs	1.0	0.4	0.4	0.8	2.0	2.5
6Lgl	13.5	23.7	1.8	1.6	13.9	8.7
WT	-	-	-	1.0	19.7	19.7

2. táblázat: A *gst* (glutation S-transzferáz) génexpressziójának növelése ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ értékek) a DNS-demetilált (DHAC-kezelt) és a paraquat stressznek kitett természetes (WT) és két 35S-*gsh1* (11ggs, 6Lgl) szürkenyár (*P. x canescens*) klónban, az α -tubulin gén kontrolljában.

(a) nem kezelt növények	
WT	1 (0,9 – 1,11)
11ggs	3,19 (3,08 – 3,30)
6Lgl	2,49 (2,25 – 2,74)
(b) kezelés: 10^{-4} M DHAC, 0 M PQ	
WT	4,9 (4,12 – 5,84)
11ggs	2,55 (2,38 – 2,73)
6Lgl	7,29 (6,50 – 8,18)
(c) kezelés: 10^{-4} M DHAC, 4×10^{-7} M PQ	
WT	11,3 (9,96 – 12,70)
11ggs	8,34 (7,12 – 9,77)

Ismert, hogy a DNS demetiláció a vegetatív klónokban öröklődik (*epigenetikus memória*), ezért a demetilációs eljárásunk (gén up-reguláció) új lehetőséget ad stressztűrő nyárfaklónok előállítására és ezek fitoremediációs alkalmazására.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az *in vitro* szelekciós kutatások elmúlt éveiben kevés figyelem fordult a fás növényekre, a regeneráció nehézségei miatt. Szántóföldi növényeknél sikerült stabil paraquat toleráns vonalakat előállítani (AMBRUS *et al.*, 2007), azonban ez fás növényeknél máig nem történt meg. Kísérleteink első részében a paraquat biológiai hatását vizsgáltuk. A laboratórium körülmények között kisselektált és fitoremediációs területre kiültetett paraquat-toleráns szürkenyár klónok hatékony biológiai eszközei az új ökoremediációs eljárásoknak, és egyben alternatív megoldást biztosítanak a GMO kontra nem-GMO kérdéshez.

A DNS demetilációjával serkentett gének és transzgének új molekuláris eszközei a biotechnológiai növénynemesítésnek. Az eljárás továbbfejlesztésével (génspecifikus demetiláció) forradalmi áttörés várható az irányított növénytermesztésben és talajvédelemben.

Az általunk előállított nyárfaklónokat szabadföldön teszteljük egy erősen szennyezett területen Fűzfőgyártelepen.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

OTKA-PD-75169, NKTH

IRODALOMJEGYZÉK

- AMBRUS, H., DARKO, É., SZABÓ, L., BAKOS, F., KIRÁLY, Z. & BARNABÁS, B. 2007. In vitro microspore selection in maize anther culture using oxidative stress stimulators. *Protoplasma* 228. 87-94.
- ARISI, A. C. M., NOCTOR, G., FOYER, C. H. & JOUANIN, L. 1997. Modification of thiol contents in poplars (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing enzymes involved in glutathione synthesis. *Planta* 203. 362-372.
- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., GULLNER, G., TÓTH, Z., KISS, J., SZABÓ, Z., KÁTAY, G., HESZKY, L. & KÖMIVES, T. 2008. Metilviológén (paraquat) toleráns nyárfaklónok (*Populus* x *canescens*) szelekciója és alkalmazása fitoremediációban. Talajvédelem in press.
- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., MALONE, R. P., GULLNER, G., KISS, J., CZAKÓ, M., MÁRTON, L., HESZKY, L. & KÖMIVES, T. 2007a. Triggering of a plant molecular defense mechanism; gene expression levels of transgene gshI and poplar gene gsh1 (*Populus* x *canescens*) in response to the DNA demethylating drug DHAC – an qRT-PCR analysis. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 42. 235-243.
- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., KISS, J., GULLNER, G., HESZKY, L. & KÖMIVES, T. 2007b. Feketenyár (*Populus nigra*) gametoklónok mikroszatellita változatossága; (TTCTGG)5 deléció a WPMS-20 lokuszon. *Agrártudományi Közlemények* 27. 60-67.
- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., HUMPHREYS, M., GULLNER, G., CSINTALAN, Z., KISS, J., SZABÓ, Z., LÁGLER, R., TÓTH, Z., RENNENBERG, H., HESZKY, L. & KÖMIVES, T. 2006. RT-PCR analysis and stress response capacity of transgenic gshI-poplar clones (*Populus* x

- canescens*) in response to paraquat exposure. Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences 61. 699-730.
- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., KISS, J., GULLNER, G., CSINTALAN, Z., SZABÓ, Z., LÁGLER, R. & KÖMIVES, T. 2005a. Stress tolerance and in vitro phytoremediation of poplar (*Populus sp.*). Hungarian Agricultural Research 14. 13-15.
 - BITTSÁNSZKY, A., KÖMIVES, T., GULLNER, G., GYULAI, G., KISS, J., HESZKY, L., RADIMSZKY, L. & RENNENBERG, H. 2005b. Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc(2+) stress. Environment International 31. 251-254.
 - BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., KISS, J., SZABÓ, Z., CSEPELÉNYI, M., LEHOCZKI, P., MÁRTA, P., RADIMSZKY, L., KÖMIVES, T. & HESZKY, L. 2004. A nehézfém és gyomirtószer hatása a gshI-transzgenikus (*P. canescens*) és szelektált (*P. nigra*) nyárfaklónok GST- és LOX- enzimaktivitására. JÁVOR, A. (ed.) Innováció, tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumban, Debrecen. pp.131-132.
 - BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., KISS, J., GULLNER, G., SZABÓ, L., RADIMSZKY, L., KÖMIVES, T. & HESZKY, L. 2003a. In vitro fitoextrakció gshI-transzgenikus nyárfaklónokkal. (ed.) EU konform mezőgazdaság és élelmiszerbiztonság. pp.49-54.
 - BITTSÁNSZKY, A., KÖMIVES, T., GULLNER, G., GYULAI, G., KISS, J., HESZKY, L., RADIMSZKY, L. & RENNENBERG, H. 2003b. Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate Zinc (2+) stress. KALOGERAKIS, N. (ed.) 2nd European Bioremediation Conference, Chania, Crete, Greece. 30 Jun - 4 July. pp. 349-352.
 - CHANEY, R. L., ANGLE, J. S., BROADHURST, C. L., PETERS, C. A., TAPPERO, R. V. & SPARKS, D. L. 2007. Improved Understanding of Hyperaccumulation Yields Commercial Phytoextraction and Phytomining Technologies. J Environ Qual 36. 1429-1443.
 - GULLNER, G., GYULAI, G., BITTSÁNSZKY, A., KISS, J., HESZKY, L. & KÖMIVES, T. 2005. Enhanced inducibility of glutathione S-transferase activity by paraquat in poplar leaf discs in the presence of sucrose. Phytomorphologia 45. 39-44.
 - GYULAI, G., TÓTH, Z., SZABÓ, Z., GULLNER, G., KISS, J., KÖMIVES, T. & HESZKY, L. 2008a. Gene up-regulation by DNA demethylation in 35S-gshI-transgenic poplars (*Populus x canescens*), p. Chapter 8, 1-22, In WOLF, T. & KOCH, J., eds. Genetically Modified Plants: New Research Trends. Nova Science Publisher, Inc.
 - GYULAI, G., BITTSÁNSZKY, A., GULLNER, G., TÓTH, Z., KISS, J., KÁTAY, G., SZABÓ, Z., KÖMIVES, T. & HESZKY, L. 2008b. A gst gén DNS-demetilált overexpressziója a szürkenyár (*Populus x canescens*) fitoremediációs kapacitásának növelésére. Talajvédelem in press.
 - GYULAI, G. 2007. DHAC-indukált transzgen-reaktiváció a 35S-gshI GMO szürkenyárban (*Populus x canescens*). Agrártudományi közlemények 27. 78-83.
 - GYULAI, G., HUMPHREYS, M., BITTSÁNSZKY, A., SKÖT, K., KISS, J., SKÖT, L., GULLNER, G., HEYWOOD, S., SZABÓ, Z., LOVATT, A., RADIMSZKY, L., RODERICK, H., RENNENBERG, H., ABBERTON, M., KÖMIVES, T. & HESZKY, L. 2005. AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic gshI-poplar clones (*Populus x canescens* L.) for copper in vitro Zeitschrift für Naturforschung C 60. 300-306.
 - GYULAI, G., KISS, J., JEKKE, Z., KISS, E. & HESZKY, L. E. 1995. A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation *in vitro*. Journal of Plant Physiology 145. 379-382.
 - KISS, J. 1999. Biotechnológiai módszerek fejlesztése és alkalmazása a hazai nyárfanemesítésben PhD dolgozat Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Gödöllő.
 - LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001 25: 402-408, Methods 25: 402-408.

- LLOYD, G. & McCOWN, B. H. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc Int Plant Prop Soc. 421-427.
- NOCTOR, G., ARISI, A. C. M., JOUANIN, L. & FOYER, C. H. 1998. Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. Plant Physiology 118. 471-482.
- PEUKE, A. D. & RENNENBERG, H. 2005. Phytoremediation. EMBO Reports 6. 497-501.